



专论与综述

## 鲍曼不动杆菌 VI 型分泌系统溶血素-联合调节蛋白研究进展

程彤彤<sup>1</sup> 万海同<sup>2</sup> 余道军<sup>\*1,3</sup>

1 浙江中医药大学第四临床医学院 浙江 杭州 310053

2 浙江中医药大学 浙江 杭州 310053

3 浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院检验科 浙江 杭州 310006

**摘要:** 鲍曼不动杆菌是一种革兰氏阴性的非发酵致病菌, 在医院环境中广泛存在, 并且已经成为医院获得性感染的重要病原体之一。近年来, 由于抗菌药物的广泛应用, 导致多重耐药鲍曼不动杆菌引起的感染和暴发流行, 给临床治疗带来了极大的挑战。有研究表明, 细菌 VI 型分泌系统与细菌的致病性相关。本文综述了鲍曼不动杆菌 VI 型分泌系统及主要功能蛋白(溶血素-联合调节蛋白)的研究进展, 以期为进一步研究鲍曼不动杆菌的致病机制提供基础。

**关键词:** 鲍曼不动杆菌, VI 型分泌系统, 溶血素-联合调节蛋白

## Role of haemolysin-coregulated protein in *Acinetobacter baumannii* type VI secretion system: a review

CHENG Tongtong<sup>1</sup> WAN Haitong<sup>2</sup> YU Daojun<sup>\*1,3</sup>

1 The Fourth Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, Zhejiang 310053, China

2 Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, Zhejiang 310053, China

3 Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, Zhejiang 310006, China

**Abstract:** *Acinetobacter baumannii* is Gram-negative non-fermentative pathogenic bacteria, which exists widely in the hospital environment and has become one of the important pathogens of hospital-acquired infection. Due to the widespread use of antibacterial drugs, the infections and outbreaks caused by multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* have brought great challenges. Recent research indicated that type VI secretion system (T6SS) might be related to the pathogenicity of bacteria. In this review, we summarized the research progress of T6SS and T6SS-related proteins (haemolysin-coregulated protein, Hcp), which provided the basis for further investigation about pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, type VI secretion system, haemolysin-coregulated protein

**Foundation items:** Key Project of National Natural Science Foundation of China (81930111); Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY17H190001); Hangzhou Health Science and Technology Project (2018ZDA001)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-571-56007155; E-mail: yudaojun98@163.com

**Received:** 15-04-2020; **Accepted:** 07-07-2020; **Published online:** 12-10-2020

**基金项目:** 国家自然科学基金重点项目(81930111); 浙江省自然科学基金(LY17H190001); 杭州市卫生科技计划重大项目(2018ZDA001)

**\*通信作者:** Tel: 0571-56007155; E-mail: yudaojun98@163.com

**收稿日期:** 2020-04-15; **接受日期:** 2020-07-07; **网络首发日期:** 2020-10-12

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, Ab)是一种普遍存在于土壤、水和人体皮肤的条件致病菌,易定植于患者的口腔、呼吸道、泌尿道、皮肤等部位,可以引起肺炎、泌尿系统感染、菌血症及皮肤感染等<sup>[1]</sup>。近年来,由于鲍曼不动杆菌耐药性的增强,导致该菌感染患者的死亡率有所上升<sup>[2-3]</sup>,引起了全球范围的广泛关注。

由于鲍曼不动杆菌的多耐药性以及粘附于非生物体表面的能力,使细菌的传播性显著增强,在一定程度上限制了我们对于鲍曼不动杆菌感染的控制能力。因此,开展鲍曼不动杆菌的感染机制研究具有重要的临床意义。鲍曼不动杆菌引起疾病的生物学过程尚不清楚,但最近的研究表明细菌分泌系统发挥了主要的作用<sup>[4]</sup>。VI型分泌系统(Type VI Secretion System, T6SS)是一种多蛋白分泌系统,广泛存在于革兰氏阴性细菌中<sup>[5]</sup>。T6SS可以通过向真核细胞注射效应蛋白参与细胞侵袭,逃逸宿主体液免疫,有助于在宿主体内持续存在并深入组织<sup>[6-7]</sup>;T6SS也可以向目标细菌注射具有抑菌或杀菌活性的效应物质,并在不同细菌物种之间的竞争中发挥作用<sup>[8-9]</sup>,其中,T6SS分泌的溶血素-联合调节蛋白(Haemolysin-coregulated Protein, Hcp)发挥了重要的作用。本文将对鲍曼不动杆菌 T6SS 研究现状及其 Hcp 分泌蛋白的功能进行介绍。

## 1 分泌系统概述

细菌已经进化出多种蛋白质分泌系统,以输出或输入跨膜大分子物质来适应环境并存活<sup>[10]</sup>。病原菌的分泌系统可以将致病因子传递到宿主细胞中,通过改善细菌的附着能力,提高细菌从环境中获取能源的能力,从而提高细菌的毒性及在宿主细胞中的生存能力。截至目前,已经在细菌中发现有7种主要的分泌系统(Type I Secretion System–Type VII Secretion System, T1SS–T7SS)<sup>[11]</sup>。其中,T2SS、T5SS是依赖信号肽(Signal Sequences, Sec)转移酶的分泌系统,T1SS、T3SS、T4SS、T6SS是不依赖Sec转移酶的分泌系统。T1SS几乎存在于所有细菌

中,可将蛋白质直接从胞内转移至胞外,并且所分泌的蛋白质不容易被水解酶水解;T2SS主要作用是分泌各种水解酶和毒素;T3SS是分泌毒力因子的重要分泌系统之一;T4SS参与DNA的水平转移,直接将蛋白质等物质注入宿主细胞<sup>[12]</sup>;T5SS是分泌系统中最大的一个,是一种自主转运蛋白系统,分泌与致病性相关的毒力蛋白;T6SS首次在霍乱弧菌和铜绿假单胞菌中被鉴定出来,作为新型的细菌蛋白分泌系统,可以介导致病菌与宿主之间的相互作用,并且与细菌的致病性相关<sup>[13-14]</sup>;T7SS主要存在于革兰氏阳性菌(如金黄色葡萄球菌)及分枝杆菌(如结核分枝杆菌)中,参与细菌毒力相关蛋白的分泌、病原菌与寄主的相互作用以及锌/铁离子的平衡<sup>[15]</sup>。在目前发现的7种细菌分泌系统中,T6SS是最新的研究热点之一,在细菌-宿主细胞相互作用及细菌-细菌竞争中发挥重要作用,如霍乱弧菌、铜绿假单胞菌等<sup>[16-18]</sup>,但是鲍曼不动杆菌的T6SS研究报道相对较少。

## 2 鲍曼不动杆菌的 T6SS

鲍曼不动杆菌耐药性和流行病学研究一直是该菌的研究重点,但对其致病机制的研究相对缺乏,尤其是鲍曼不动杆菌毒力因子(Virulence Factor, VF)的分泌以及传递到宿主细胞有关的机制研究相对较少<sup>[19]</sup>。鲍曼不动杆菌毒力因子分泌与传递过程可能涉及一些蛋白质分泌系统,如I型分泌系统(T1SS)、II型分泌系统(T2SS)和VI型分泌系统(T6SS)以及其他机制,如外膜囊泡<sup>[4]</sup>。研究表明,通过分泌系统,细菌可以从外部环境获得营养并向其分泌效应蛋白质直接作用于靶细胞,从而导致细菌感染<sup>[11]</sup>。T1SS介导鲍曼不动杆菌生物膜的形成,促进细菌对宿主细胞的粘附<sup>[20]</sup>,T2SS通过分泌具有活性的毒素和水解酶来获取营养,提高细菌的毒力和宿主内的存活力<sup>[4]</sup>。目前研究表明T6SS最具特征性,T6SS可以通过其分泌的效应蛋白杀伤靶细胞,并且还可以作为细菌间竞争的关键武器<sup>[21]</sup>。

T6SS是一种将革兰氏阴性细菌细胞质中的效

应因子直接注入到邻近细胞的收缩性注射装置,用于细菌间竞争或诱导真核细胞中的免疫应答<sup>[21-22]</sup>。同时 T6SS 也是重要的毒力系统,与增强细菌的致病性密切相关<sup>[23]</sup>。T6SS 可以提高细菌的粘附和侵袭能力,以适应在巨噬细胞内存活,也可以促进细菌间的竞争,使细菌获得竞争性优势<sup>[13,24]</sup>。

尽管 T6SS 复合物的分辨率结构尚不清楚,但目前普遍认为 T6SS 在结构与功能上类似于噬菌体尾鞘<sup>[25]</sup>,通常由 13 个保守的核心蛋白组成<sup>[26-27]</sup>,其中 3 种主要蛋白:溶血素-联合调节蛋白形成一个管状结构;缬氨酸-甘氨酸-精氨酸 G (VgrG)蛋白位于结构的顶端,具有效应器活性并能促进效应器分泌;TssB/TssC 蛋白形成一个鞘,其收缩为效应蛋白的运输提供能量<sup>[28]</sup>。T6SS 可以分泌多种效应因子,目前已鉴定出的效应因子包括 C-末端结构域(Carboxy-Terminal Domain, CTD)毒素、VgrG 蛋白、Hcp、PAAR、肽聚糖水解酶、脂肪酶、磷脂酶和核酸酶等<sup>[29]</sup>,这些效应因子确保细菌与宿主细胞相互作用,然而这些效应因子的特性以及参与 T6SS 效应机制的研究尚不清楚。目前, T6SS 中功能研究最清楚的是 Hcp,该蛋白可以作为 T6SS 的活性标记物在鲍曼不动杆菌的致病过程中发挥重要的作用<sup>[22]</sup>。

有文献报道不动杆菌基因组中携带编码 T6SS 的基因<sup>[30-31]</sup>。Carruthers 等<sup>[21]</sup>发现鲍曼不动杆菌菌株的染色体上存在 18 个基因组成的基因簇,这些基因编码 T6SS。另外,研究者鉴定了编码 T6SS 13 个核心蛋白基因(*tssA*、*tssB*、*tssC*、*tssD/hcp*、*tssE*、*tssF*、*tssG*、*tssH*、*tssI/VgrG*、*tssJ*、*tssK*、*tssL*、*tssM*)中的 12 个基因,以及与其他细菌中 T6SS 相关的 2 个蛋白基因(*tagF*、*tagN*)和 5 个仅存在于不动杆菌属中的蛋白基因(*asaA*、*asaB*、*asaC*、*asaD*、*asaE*)<sup>[21,31]</sup>,但是没有检测到与 T6SS 核心蛋白 TssJ 相同的蛋白质<sup>[32]</sup>。有研究表明, T6SS 基因簇在鲍曼不动杆菌菌株中保守性较高,但不同菌株的 Hcp 分泌量存在差异<sup>[32-34]</sup>。另外,不同的鲍曼不动杆菌菌株中还存在与 VgrG 蛋白相关的编码基因,以及

一些分泌毒素和同源免疫蛋白<sup>[35]</sup>。鲍曼不动杆菌 T6SS 的较高保守性及其特异性可提升其与共存细菌(例如大肠杆菌、铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯杆菌等)的竞争优势,特别是在特定的生态位上确保其竞争力<sup>[33-35]</sup>。

T6SS 是多功能的,不仅能够调节细菌之间的相互作用,还能维持细菌的致病性并与宿主细胞保持共生关系。研究发现细菌在感染宿主细胞时, T6SS 基因簇表达上调提高了细菌的致病性<sup>[29]</sup>;另外,携带 T6SS (T6SS<sup>+</sup>)具有更高的生物膜形成活性,在宿主细胞中的存活率高于 T6SS 阴性(T6SS<sup>-</sup>)菌株,并且细菌竞争能力也更强<sup>[36]</sup>。

### 3 鲍曼不动杆菌的 Hcp

Hcp 形成六聚体小管结构<sup>[22]</sup>(图 1),与噬菌体尾蛋白 GpV 在结构上具有相似性<sup>[37]</sup>,作为毒力因子、效应因子的转运子和伴侣发挥作用,而 VgrG 蛋白类似于 T4 噬菌体的 gp27/gp5 形成的复合物,其中的 CTD<sup>[28]</sup>发挥效应活性。尽管 Hcp 和 VgrG 蛋白的分泌是相互依赖的,并且对保持 T6SS 的活性是必需的,但研究证明一个生物体通常具有多个类似的 VgrG 蛋白,并且每个 VgrG 蛋白对 Hcp 分泌可能不是必需的<sup>[38-40]</sup>。最近研究发现, Hcp 和 VgrG 蛋白是细菌不同效应器输出途径所必需的 2 种蛋白分子<sup>[41]</sup>。Hcp 可通过其环状结构<sup>[42]</sup>

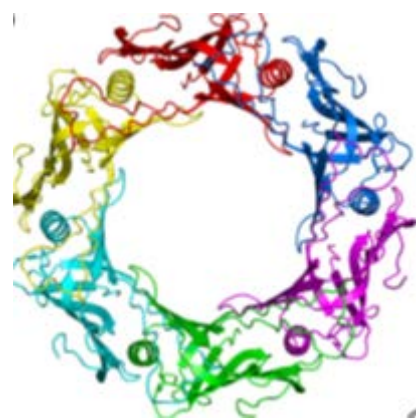


图 1 Hcp 结构图<sup>[22]</sup>

Figure 1 The structure of Hcp<sup>[22]</sup>

的内部残基与效应因子相互作用,而含有 PAAR 结构域的蛋白质可与 VgrG 蛋白三聚体<sup>[43]</sup>的末端相互作用。其他的重要成分包括 TssB/TssC 蛋白,它们组装成类似噬菌体鞘的细胞质结构,并在伸展状态和收缩状态之间迅速变化<sup>[41]</sup>,可以容纳 Hcp 小管,并且在收缩时被另一个必需的 T6SS 成分 ClpV (TssH)回收<sup>[44]</sup>。

Hcp 既是 T6SS 的结构蛋白,也是一种效应因子(效应蛋白)。Hcp 在具有活性 T6SS 的细菌中大量分泌到培养上清液中,使其成为功能性 T6SS 的分子标记物<sup>[22,45]</sup>。Hcp 形成的六聚体小管结构可以穿透并跨越细菌细胞膜,使其在细菌表面暴露,这解释了为什么可以在细菌培养上清液中检测到 Hcp 的存在<sup>[22]</sup>。Hcp 不仅是 T6SS 自身分泌的效应因子,还是 T6SS 分泌其他效应因子的伴侣和受体<sup>[38]</sup>。

鲍曼不动杆菌临床分离株中,约 1/3 菌株携带 *hcp* 基因,特定的鲍曼不动杆菌序列分型(Sequence Types, STs)与其 *hcp* 基因携带与否密切相关<sup>[19]</sup>,表明 T6SS 基因簇只存在于特定的菌株中<sup>[46-47]</sup>,并非所有鲍曼不动杆菌都具有功能性 T6SS。引起这种现象的可能假设是,在抗生素治疗过程中,细菌逃避宿主免疫系统的攻击或者细菌间竞争,导致 *hcp* 基因丢失<sup>[19]</sup>。

近几年关于鲍曼不动杆菌 Hcp 的研究层出不穷,但较多的研究都是通过敲除 *hcp* 上、下游基因(*tssM*、*tssB*、*VgrG* 等)<sup>[23,32]</sup>探讨 Hcp 在影响细菌耐药性、生物膜形成、细菌间杀伤竞争和细菌-细胞相互作用等方面发挥的作用,对其生物学功能及其致病机制有待深入研究。

### 3.1 Hcp 的分泌和调控

T6SS 的激活可以促进 Hcp 和 VgrG 蛋白的分泌,同时破坏靶细胞的包膜,具有潜在的杀伤作用。这些效应蛋白同时还可以作为 T6SS 的效应器,参与细菌间的竞争作用。与其他细菌不同的是,鲍曼不动杆菌中 VgrG 蛋白 CTD 是功能性 T6SS 的关键成分<sup>[48]</sup>。VgrG 蛋白以 T6SS 依赖的方式分泌,并且可以促进有毒物质和其他效应因子的分泌<sup>[49]</sup>,

这些物质对 Hcp 的分泌和 T6SS 的功能也很重要。研究证明在相同的培养条件下,不同菌株的 Hcp 表达和分泌量存在差异,但其氨基酸序列都是相同的<sup>[22]</sup>,表明 Hcp 在不同鲍曼不动杆菌菌株中是保守和共通的,但影响其表达和分泌的因素较多,有待进一步深入研究。

鲍曼不动杆菌 Hcp 的分泌受多种因素的调控,TssB/TssM 限制 Hcp 的分泌,但对 Hcp 在胞内的合成没有影响<sup>[21,32]</sup>。另外,Fitzsimons 等<sup>[50]</sup>发现 Hcp 的分泌不受单个 VgrG 蛋白缺失的影响,还有研究证明 AsaA 也参与了 Hcp 的分泌<sup>[51]</sup>,然而最新研究发现 VgrG 蛋白同源物可以抑制 Hcp 的分泌,从而抑制 T6SS 的活性<sup>[48]</sup>。此外还发现铁离子( $\text{Fe}^{3+}$ )可以促进 Hcp 的表达<sup>[52]</sup>。铁离子作为细菌营养来源之一,对鲍曼不动杆菌的生长具有重要影响<sup>[53]</sup>,但是浓度过高却会对细菌产生毒性作用<sup>[54]</sup>。铁离子的水平对鲍曼不动杆菌的毒力至关重要。研究表明,铁离子可抑制细菌 T6SS 的表达,而当铁缺乏时可使 T6SS 稳定表达<sup>[55]</sup>。作为铁调节系统中重要的调节剂<sup>[56]</sup>,铁吸收调节蛋白(Ferric Uptake Regulator, Fur)对 T6SS 的表达调控具有铁离子依赖性,铁缺乏时,Fur 对 T6SS 抑制减弱,T6SS 表达开放,铁充足时 Fur 抑制 T6SS 表达<sup>[28]</sup>。因此,铁离子对 Hcp 表达的调控可能与铁离子调控系统相关,而且具有铁离子浓度依赖性。

### 3.2 Hcp 对细菌耐药性的影响

鲍曼不动杆菌产生多重耐药性的原因之一是其携带的多重耐药基因有关,并且不同地区的用药不同,也导致了耐药机制的差别<sup>[57-58]</sup>。鲍曼不动杆菌中存在四环素抗性(Tetracycline Resistance, TetR)相关调节蛋白的耐药质粒,而且耐药质粒的存在会沉默 T6SS 的功能,提高细菌的耐药性<sup>[34]</sup>,这表明细菌对部分抗生素的耐药机制与 T6SS 活化之间存在负调节。Kim 等研究发现不表达 Hcp 的菌株中可检测到 *tetR*,表现为对四环素及替加环素耐药性增强,但对其他抗菌药物耐药性降低<sup>[36]</sup>。

### 3.3 Hcp 对生物膜的影响

细菌生物膜的形成有助于提高细菌耐药性, 帮助细菌逃避宿主免疫反应, 有利于细菌在宿主体内存活<sup>[59-60]</sup>, 因此生物膜与细菌致病性有着密切关系。研究表明 T1SS、外膜蛋白 A (OmpA) 与细菌生物膜的形成有密切关系<sup>[20,61]</sup>, 而 T6SS 结构基因的缺失可导致生物膜形成缺陷<sup>[62]</sup>。如: 在侵袭性大肠杆菌中, *hcp2* 基因缺失株通过影响其生物膜的形成能力降低对细胞的粘附性, 从而降低对细胞的感染能力<sup>[63]</sup>; 在嗜水气单胞菌中, *hcp3* 可以促进生物膜的形成<sup>[64]</sup>, 增强细菌的粘附性和致病性, 表明 *hcp* 基因与细菌生物膜的形成具有相关性。但是, 有关鲍曼不动杆菌 *hcp* 基因与细菌生物膜形成的关联研究较少。

### 3.4 Hcp 在细菌竞争中的影响

鲍曼不动杆菌在与其他细菌共存时, 以 T6SS 接触依赖的方式将其他细菌杀死。研究发现 T6SS 基因簇在鲍曼不动杆菌不同菌株(鲍曼不动杆菌 ATCC17978、鲍曼不动杆菌 DSM30011 和临床多耐药株)中具有转录活性, 而只有鲍曼不动杆菌 DSM30011 菌株能竞争性杀死大肠杆菌, 并且该菌对大肠杆菌的靶向和杀伤作用依赖于 Hcp 的分泌<sup>[21,33]</sup>。进一步研究表明, 鲍曼不动杆菌 DSM30011 还能以 T6SS 接触依赖的方式杀死鲍曼不动杆菌 ATCC17978、铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯杆菌<sup>[33]</sup>。鲍曼不动杆菌的 T6SS 不仅可以在种间发挥作用, 还可以在鲍曼不动杆菌种内发挥竞争性杀伤作用, 并且鲍曼不动杆菌 Hcp 表达差异的菌株对大肠杆菌的杀伤能力具有明显的差异。此外, 鲍曼不动杆菌对周围细菌的杀伤能力与其 Hcp 分泌量也有关, Hcp 分泌量的不同导致 T6SS 的活性不同<sup>[32,34]</sup>。表明这些菌株的 T6SS 在功能上具有显著的差异, T6SS 在 DSM30011 菌株中的竞争作用最强大, 这可能与菌株特异性有关。

### 3.5 Hcp 在细菌-宿主作用之间的影响

细菌细胞质内鞘的收缩推动由 Hcp 组成的内管

道(结构蛋白)通过 VgrG 和 PAAR 组成的收缩刺穿装置顶向靶细胞, Hcp (效应蛋白)与这个收缩结构相关的效应因子结合<sup>[6,65-66]</sup>, 被转运到宿主细胞中, 参与细胞侵袭, 从而引起感染。在鲍曼不动杆菌引起的呼吸道感染中, 尤其由定植于呼吸道鲍曼不动杆菌引发的感染中, Hcp 发挥了主导作用; Hcp 等效应因子对细胞的杀伤作用易引起(或诱导)宿主细胞对细菌的免疫反应从而介导细胞对细菌的杀伤作用, 引起炎症反应<sup>[67]</sup>。

### 3.6 Hcp 在细菌毒力中的影响

T6SS 因其在细菌与真核细胞相互作用中的多种功能而被认为是影响细菌存活和毒力的重要因素之一。细菌的毒力因子通过影响细菌的生长、粘附和侵袭力影响细菌的致病性, 然而鲍曼不动杆菌 T6SS 对宿主细胞粘附/侵袭力的相关研究极少<sup>[68]</sup>。Repizo 等<sup>[33]</sup>证实 T6SS 分泌的 Hcp 与细菌的毒力有关。研究表明, 细菌可以通过增强耐药性进而提高其自身的毒力, 并且细菌 T6SS 基因与细菌的毒力密切相关<sup>[69]</sup>, 而鲍曼不动杆菌可能也是通过耐药性增强其毒力。因此, 进一步探讨 Hcp 与细菌毒力的具体关系对临床治疗鲍曼不动杆菌具有重要意义。

另外, Chen 等研究发现钙可以通过调节鲍曼不动杆菌相关基因(*ompA*、*bfpRS*、*abaI*)的表达, 增加该菌对上皮细胞的粘附/侵袭, 有效控制钙离子浓度可为多药耐药鲍曼不动杆菌的防治提供新途径<sup>[70]</sup>。然而钙与 Hcp 蛋白之间的关系并没有详细说明, 这一点也值得我们进一步探讨。

## 4 小结与展望

已有研究发现 T6SS 中的 Hcp 蛋白在细菌的致病性、细菌与细胞相互作用、细菌种间竞争和细菌的环境适应性等方面发挥重要作用<sup>[21,71]</sup>。鉴于 Hcp 主要发挥运输功能或分子伴侣的功能, 是否可设计合成特异性结合 Hcp 的抗体从而抑制 T6SS 的组装及 Hcp 分子伴侣的功能值得进一步研究。近年来, 鲍曼不动杆菌与宿主的相互作用, 尤其是关于免疫应答的复杂作用已成为研究热点。大量研究已经揭

示了蛋白分泌系统对细菌生存的重要性。T6SS 作为革兰氏阴性菌中广泛存在的一种蛋白分泌系统,其结构和致病机制的研究已经取得了重大的进展。尽管如此,对鲍曼不动杆菌蛋白分泌系统作用机制的认识才刚开始,特别是其分泌的 Hcp 的功能研究尚处于初步阶段,对于鲍曼不动杆菌 T6SS 仍存在较多假想蛋白质,尤其对于不同鲍曼不动杆菌菌株中 T6SS 活性及功能仍有待进一步证实。

Hcp 作为 T6SS 效应因子发挥作用时是否需要其他伴侣蛋白的运输和传递这一机制研究尚不清楚,以及 Hcp 的效应靶标和其分泌的影响因素值得我们进一步研究,为其致病机制的研究奠定基础。目前, Hcp 的分离提取技术相对不成熟,多采用超滤法对其进行提取分离,但滤膜可能会对蛋白有所损耗,影响蛋白得率, Western Blot 常被用于 Hcp 蛋白的检测,但是 Western Blot 检测方法中所使用的抗体需要自制,制备过程比较烦琐,这将影响后续 Hcp 蛋白功能的研究。因此,开发一种新的快速高效的蛋白分离提取方法将为更深入地研究 Hcp 提供研究基础。另外,对于 Hcp 活性蛋白提取分离技术的研究较少,本项目组采用一步法细菌活性蛋白提取试剂盒进行提取分离,得率较低, Native-PAGE 电泳结果较差,因此有必要研制一种新型高效的 Hcp 活性蛋白提取试剂,可为以外源性 Hcp 为靶标的疫苗开发研究提供技术支持,从而能够更好地控制耐药鲍曼不动杆菌引起的感染。

鲍曼不动杆菌可以利用 T6SS 运输毒性效应蛋白到宿主细胞中,发生一系列的相互作用,导致宿主发生疾病。这一过程是引起疾病发生的关键因素,为研究鲍曼不动杆菌致病性提供了参考价值,同时也为疾病的治疗提供了一定的临床价值。鲍曼不动杆菌还可以通过接触依赖的方式与其他细菌进行竞争,不同菌株的杀菌能力和分泌 Hcp 蛋白的能力有所差别,这有助于了解致病菌之间相互竞争的能力。综合前面所述,鲍曼不动杆菌 T6SS 与其毒力、环境适应性等方面密不可分,尤其在细菌-宿主细胞、细菌-细菌相互竞争中发挥着重要

作用,这为临床多菌治疗提供了一定思路。同时,了解鲍曼不动杆菌感染的机制、研究分泌系统效应蛋白(如 Hcp 等)的输送途径及效应蛋白分泌的影响因素,有助于开发新的治疗靶点,从而改变细菌的环境适应性,以防细菌逃避宿主的免疫杀伤反应。因此,对于 T6SS 及其分泌蛋白的机制作用研究将有助于进一步了解鲍曼不动杆菌的致病性,并为疾病的预防和治疗提供基础。

## REFERENCES

- [1] Dexter C, Murray GL, Paulsen IT, Peleg AY. Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis[J]. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 2015, 13(5): 567-573
- [2] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2008, 21(3): 538-582
- [3] Khan SN, Khan AU. Breaking the spell: combating multidrug resistant 'superbugs'[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 174
- [4] Weber BS, Kinsella RL, Harding CM, Feldman MF. The secrets of *Acinetobacter* secretion[J]. Trends in Microbiology, 2017, 25(7): 532-545
- [5] Bingle LEH, Bailey CM, Pallen MJ. Type VI secretion: a beginner's guide[J]. Current Opinion in Microbiology, 2008, 11(1): 3-8
- [6] Ma AT, McAuley S, Pukatzki S, Mekalanos JJ. Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells[J]. Cell Host & Microbe, 2009, 5(3): 234-243
- [7] Suarez G, Sierra JC, Erova TE, Sha J, Horneman AJ, Chopra AK. A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(1): 155-168
- [8] Murdoch SL, Trunk K, English G, Fritsch MJ, Pourkarimi E, Coulthurst SJ. The opportunistic pathogen *Serratia marcescens* utilizes type VI secretion to target bacterial competitors[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(21): 6057-6069
- [9] Russell AB, Singh P, Brittnacher M, Bui NK, Hood RD, Carl MA, Agnello DM, Schwarz S, Goodlett DR, Vollmer W, et al. A widespread bacterial type VI secretion effector superfamily identified using a heuristic approach[J]. Cell Host & Microbe, 2012, 11(5): 538-549
- [10] Lien YW, Lai EM. Type VI secretion effectors: methodologies and biology[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 254
- [11] Chen LH, Zou YR, She PF, Wu Y. Composition, function,



- and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiological Research, 2015, 172: 19-25
- [12] Backert S, Meyer TF. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis[J]. Current Opinion in Microbiology, 2006, 9(2): 207-217
- [13] Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, Heidelberg JF, Mekalanos JJ. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(5): 1528-1533
- [14] Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, Goodman AL, Joachimiak G, Ordoñez CL, Lory S, et al. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus[J]. Science, 2006, 312(5779): 1526-1530
- [15] Cao ZP, Casabona MG, Kneuper H, Chalmers JD, Palmer T. The type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* secretes a nuclease toxin that targets competitor bacteria[J]. Nature Microbiology, 2017, 2(1): 16183
- [16] Ho BT, Fu Y, Dong TG, Mekalanos JJ. *Vibrio cholerae* type 6 secretion system effector trafficking in target bacterial cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(35): 9427-9432
- [17] Kostiuk B, Unterwieser D, Provenzano D, Pukatzki S. T6SS intraspecific competition orchestrates *Vibrio cholerae* genotypic diversity[J]. International Microbiology, 2017, 20(3): 130-137
- [18] Basler M, Ho BT, Mekalanos JJ. Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions[J]. Cell, 2013, 152(4): 884-894
- [19] Repizo GD. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* strains expressing the type 6 secretion system in patients with bacteremia[J]. Virulence, 2017, 8(7): 1099-1101
- [20] Harding CM, Pulido MR, Di Venzio G, Kinsella RL, Webb AI, Scott NE, Pachón J, Feldman MF. Pathogenic *Acinetobacter* species have a functional type I secretion system and contact-dependent inhibition systems[J]. Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(22): 9075-9087
- [21] Carruthers MD, Nicholson PA, Tracy EN, Munson Jr RS. *Acinetobacter baumannii* utilizes a type VI secretion system for bacterial competition[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59388
- [22] Ruiz FM, Santillana E, Spínola-Amilibia M, Torreira E, Culebras E, Romero A. Crystal structure of hcp from *Acinetobacter baumannii*: a component of the type VI secretion system[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0129691
- [23] Wang JF, Zhou ZH, He F, Ruan Z, Jiang Y, Hua XT, Yu YS. The role of the type VI secretion system *vgrG* gene in the virulence and antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606[J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0192288
- [24] Hood RD, Singh P, Hsu F, Güvener T, Carl MA, Trinidad RRS, Silverman JM, Ohlson BB, Hicks KG, Plemel RL, et al. A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria[J]. Cell Host & Microbe, 2010, 7(1): 25-37
- [25] Basler M, Pilhofer M, Henderson GP, Jensen GJ, Mekalanos JJ. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure[J]. Nature, 2012, 483(7388): 182-186
- [26] Wang P, Zou QH. Advances in hemolysin co-regulated protein of bacterial type VI secretion system[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2018, 46(3): 67-71 (in Chinese)  
王萍, 邹清华. 细菌VI型分泌系统溶血素共调节蛋白研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2018, 46(3): 67-71
- [27] Zoued A, Brunet YR, Durand E, Aschtgen MS, Logger L, Douzi B, Journet L, Cambillau C, Cascales E. Architecture and assembly of the type VI secretion system[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2014, 1843(8): 1664-1673
- [28] Silverman JM, Brunet YR, Cascales E, Mougous JD. Structure and regulation of the type VI secretion system[J]. Annual Review of Microbiology, 2012, 66: 453-472
- [29] Durand E, Cambillau C, Cascales E, Journet L. VgrG, tae, tle, and beyond: the versatile arsenal of type VI secretion effectors[J]. Trends in Microbiology, 2014, 22(9): 498-507
- [30] De Berardinis V, Vallenet D, Castelli V, Besnard M, Pinet A, Cruaud C, Samair S, Lechaplais C, Gyapay G, Richez C, et al. A complete collection of single-gene deletion mutants of *Acinetobacter baylyi* ADP1[J]. Molecular Systems Biology, 2008, 4(1): 174
- [31] Henry R, Vithanage N, Harrison P, Seemann T, Coutts S, Moffatt JH, Nation RL, Li J, Harper M, Adler B, et al. Colistin-resistant, lipopolysaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* responds to lipopolysaccharide loss through increased expression of genes involved in the synthesis and transport of lipoproteins, phospholipids, and poly- $\beta$ -1,6-*N*-acetylglucosamine[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, 56(1): 59-69
- [32] Weber BS, Miyata ST, Iwashkiw JA, Mortensen BL, Skaar EP, Pukatzki S, Feldman MF. Genomic and functional analysis of the type VI secretion system in *Acinetobacter*[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e55142
- [33] Repizo GD, Gagné S, Foucault-Grunenwald ML, Borges V, Charpentier X, Limansky AS, Gomes JP, Viale AM, Salcedo SP. Differential role of the T6SS in *Acinetobacter baumannii* virulence[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0138265
- [34] Weber BS, Ly PM, Irwin JN, Pukatzki S, Feldman MF. A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for type VI secretion in *Acinetobacter baumannii*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(30): 9442-9447
- [35] Weber BS, Hennon SW, Wright MS, Scott NE, De Berardinis V, Foster LJ, Ayala JA, Adams MD, Feldman MF. Genetic dissection of the type VI secretion system in *Acinetobacter* and identification of a novel peptidoglycan

- hydrolase, TagX, required for its biogenesis[J]. *mBio*, 2016, 7(5): e01253-16
- [36] Kim J, Lee JY, Lee H, Choi JY, Kim DH, Wi YM, Peck KR, Ko KS. Microbiological features and clinical impact of the type VI secretion system (T6SS) in *Acinetobacter baumannii* isolates causing bacteremia[J]. *Virulence*, 2017, 8(7): 1378-1389
- [37] Leiman PG, Basler M, Ramagopal UA, Bonanno JB, Sauder JM, Pukatzki S, Burley SK, Almo SC, Mekalanos JJ. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(11): 4154-4159
- [38] Clemens DL, Ge P, Lee BY, Horwitz MA, Zhou ZH. Atomic structure of T6SS reveals interlaced array essential to function[J]. *Cell*, 2015, 160(5): 940-951
- [39] Brunet YR, Zoued A, Boyer F, Douzi B, Cascales E. The type VI secretion TssEFGK-VgrG phage-like baseplate is recruited to the TssJLM membrane complex via multiple contacts and serves as assembly platform for tail tube/sheath polymerization[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(10): e1005545
- [40] Cianfanelli FR, Diniz JA, Guo MM, De Cesare V, Trost M, Coulthurst SJ. VgrG and PAAR proteins define distinct versions of a functional type VI secretion system[J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(6): e1005735
- [41] Whitney JC, Beck CM, Goo YA, Russell AB, Harding BN, De Leon JA, Cunningham DA, Tran BQ, Low DA, Goodlett DR, et al. Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 92(3): 529-542
- [42] Silverman JM, Agnello DM, Zheng HJ, Andrews BT, Li M, Catalano CE, Gonen T, Mougous JD. Haemolysin coregulated protein is an exported receptor and chaperone of type VI secretion substrates[J]. *Molecular Cell*, 2013, 51(5): 584-593
- [43] Shneider MM, Buth SA, Ho BT, Basler M, Mekalanos JJ, Leiman PG. PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike[J]. *Nature*, 2013, 500(7462): 350-353
- [44] Kapitein N, Bönemann G, Pietrosiuk A, Seyffer F, Hausser I, Locker JK, Mogk A. ClpV recycles VipA/VipB tubules and prevents non-productive tubule formation to ensure efficient type VI protein secretion[J]. *Molecular Microbiology*, 2013, 87(5): 1013-1028
- [45] Pukatzki S, McAuley SB, Miyata ST. The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2009, 12(1): 11-17
- [46] Wright MS, Haft DH, Harkins DM, Perez F, Hujer KM, Bajaksouzian S, Benard MF, Jacobs MR, Bonomo RA, Adams MD. New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis[J]. *mBio*, 2014, 5(1): e00963-13
- [47] Jones CL, Clancy M, Honnold C, Singh S, Snesrud E, Onmus-Leone F, McGann P, Ong AC, Kwak Y, Waterman P, et al. Fatal outbreak of an emerging clone of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* with enhanced virulence[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2015, 61(2): 145-154
- [48] Lopez J, Ly PM, Feldman MF. The tip of the VgrG spike is essential to functional type VI secretion system assembly in *Acinetobacter baumannii*[J]. *mBio*, 2020, 11(1): e02761-19
- [49] Hachani A, Allsopp LP, Oduko Y, Filloux A. The VgrG proteins are “à la carte” delivery systems for bacterial type VI effectors[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(25): 17872-17884
- [50] Fitzsimons TC, Lewis JM, Wright A, Kleifeld O, Schittenhelm RB, Powell D, Harper M, Boyce JD. Identification of novel *Acinetobacter baumannii* type VI secretion system antibacterial effector and immunity pairs[J]. *Infection and Immunity*, 2018, 86(8): e00297-18
- [51] Li L, Wang YN, Jia HB, Wang P, Dong JF, Deng J, Lu FM, Zou QH. The type VI secretion system protein AsaA in *Acinetobacter baumannii* is a periplasmic protein physically interacting with TssM and required for T6SS assembly[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 9438
- [52] Stocks CJ, Phan MD, Achard MES, Nhu NTK, Condon ND, Gawthorne JA, Lo AW, Peters KM, McEwan AG, Kapetanovic R, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* employs both evasion and resistance to subvert innate immune-mediated zinc toxicity for dissemination[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(13): 6341-6350
- [53] Bohac TJ, Shapiro JA, Wencewicz TA. Rigid oxazole acinetobactin analog blocks siderophore cycling in *Acinetobacter baumannii*[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2017, 3(11): 802-806
- [54] Wyckoff EE, Mey AR, Leimbach A, Fisher CF, Payne SM. Characterization of ferric and ferrous iron transport systems in *Vibrio cholerae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(18): 6515-6523
- [55] Brunet YR, Bernard CS, Gavioli M, Lloubès R, Cascales E. An epigenetic switch involving overlapping fur and DNA methylation optimizes expression of a type VI secretion gene cluster[J]. *PLoS Genetics*, 2011, 7(7): e1002205
- [56] Carpenter BM, Whitmire JM, Merrell DS. This is not your mother's repressor: the complex role of fur in pathogenesis[J]. *Infection and Immunity*, 2009, 77(7): 2590-2601
- [57] Li RQ, Yu DJ, Xiang GQ, Chen YM, Bai XQ, Wang WJ. Study on drug-resistant phenotype and genotype of *Acinetobacter baumannii*[J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2013, 29(10): 1539-1541 (in Chinese)
- 李荣群, 余道军, 项国谦, 陈岳明, 柏向群, 王纬嘉. 鲍曼不动杆菌耐药表型与基因型相关性[J]. *中国公共卫生*, 2013, 29(10): 1539-1541



- [58] Lu Z, Wang XL, Yu DJ. Analysis on drug-resistant phenotype and genotype of *Acinetobacter baumannii*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2016, 28(9): 1029-1033 (in Chinese)  
卢珍, 王晓磊, 余道军. 鲍曼不动杆菌耐药表型与基因型分析[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(9): 1029-1033
- [59] Roilides E, Simitsopoulou M, Katragkou A, Walsh TJ. How biofilms evade host defenses[J]. Microbiology Spectrum, 2015. DOI:10.1128/microbiolspec.MB-0012-2014
- [60] Yan J, Bassler BL. Surviving as a community: antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms[J]. Cell Host & Microbe, 2019, 26(1): 15-21
- [61] Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells[J]. Infection and Immunity, 2009, 77(8): 3150-3160
- [62] Zhang LQ, Xu JS, Xu J, Zhang H, He LY, Feng J. TssB is essential for virulence and required for type VI secretion system in *Ralstonia solanacearum*[J]. Microbial Pathogenesis, 2014, 74: 1-7
- [63] Ding XY, Zhang Q, Wang H, Quan GM, Zhang D, Ren WK, Liao YX, Xia PP, Zhu GQ. The different roles of *hcp*<sub>1</sub> and *hcp*<sub>2</sub> of the type VI secretion system in *Escherichia coli* strain CE129[J]. Journal of Basic Microbiology, 2018, 58(11): 938-946
- [64] Wang NN, Liu J, Pang MD, Wu YF, Awan F, Liles MR, Lu CP, Liu YJ. Diverse roles of Hcp family proteins in the environmental fitness and pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* Chinese epidemic strain NJ-35[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(16): 7083-7095
- [65] Burkinshaw BJ, Liang XY, Wong MG, Le ANH, Lam L, Dong TG. A type VI secretion system effector delivery mechanism dependent on PAAR and a chaperone-co-chaperone complex[J]. Nature Microbiology, 2018, 3(5): 632-640
- [66] Bleves S. Don't judge a book by its cover: the Hcps are not only structural components of the T6SS machinery[J]. Virulence, 2017, 8(7): 1053-1054
- [67] Hu YY, Liu CX, Liu P, Wu ZY, Zhang YD, Xiong XS, Li XY. Regulation of gene expression of *hcp*, a core gene of the type VI secretion system in *Acinetobacter baumannii* causing respiratory tract infection[J]. Journal of Medical Microbiology, 2018, 67(7): 945-951
- [68] Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(2): 91-102
- [69] Troxell B. A type 6 secretion system (T6SS) encoded gene within *Salmonella enterica* serovar enteritidis contributes to virulence[J]. Virulence, 2018, 9(1): 585-587
- [70] Chen Y, Shao TJ, Fang SH, Pan P, Jiang JH, Cheng TT, Wan HT, Yu DJ. Effect of calcium on the interaction of *Acinetobacter baumannii* with human respiratory epithelial cells[J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 264
- [71] Costa TRD, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, Waksman G. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(6): 343-359